

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770099
 研究課題名 (和文) 蛋白質合成におけるヘムと一酸化窒素のクロストーク：
 翻訳開始因子キナーゼについて
 研究課題名 (英文) Interaction of heme and nitric oxide with heme-regulated inhibitor
 (HRI)
 研究代表者
 五十嵐 城太郎 (IGARASHI JOTARO)
 東北大学・多元物質科学研究所・助教
 研究者番号：80375162

研究成果の概要：ヘム調節インヒビター (HRI) の分子レベルでの活性調節機構を明らかにするために、ヘム結合部位の同定、一酸化窒素による *S*-ニトロシル化反応、自己リン酸化反応、及びドメイン間の相互作用を解析した。ヘムはヘム制御モチーフと呼ばれる Cys-Pro を含む配列に結合し、活性調節に重要であることがわかった。また、ヘム結合により N 末端ドメインとキナーゼドメイン間に相互作用が生じ、構造変化することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	0	2,700,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	210,000	3,610,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：ヘム、一酸化窒素、自己リン酸化、*S*-ニトロシル化

1. 研究開始当初の背景

赤血球成熟の過程において、ヘモグロビンの合成は熱ショック、ヘム不足などのストレスにตอบสนองして調節されている。特に、脱核後の網状赤血球では、核による転写調節が不可能となり、ヘモグロビン合成は翻訳レベルで調節を受けることになる。

ヘム調節インヒビター (HRI) は、真核生物翻訳開始因子 2α (eIF2 α) を基質とするセリン・スレオニンキナーゼであり、ミトコンドリアでのヘム生産量に応じてヘモグロビンの生産量を調節する鍵酵素である。すなわち、網状赤血球がヘム不足に陥ると、HRI は自己リン酸化によって活性化し、eIF2 α をリン酸化することで、ヘモグロビンの合成

を停止させる。

HRI の役割については、標準的な生化学・分子生物学の教科書にも記述されている。しかし、30 年以上にわたる HRI の研究にも関わらず、HRI の活性調節機構について分子レベルでの理解は十分ではない。

私たちの研究グループでは、HRI はヘムを 1 等量結合し、N 末端ドメインとキナーゼドメインに由来するアミノ酸残基と結合することを明らかにした (*Biochemistry*, 45, 9894 (2006))。また、ヘムに一酸化窒素 (NO) が結合すると、タンパク質とヘムとの配位結合が切れ、活性化することも示した (*J. Biol. Chem.* 279, 15752 (2004))。

2. 研究の目的

分子レベルにおけるHRIの活性調節機構を詳細に検討するために、以下のサブ研究テーマを設定した。

- (1)ヘムに結合するアミノ酸残基を同定する。
- (2)NOによる活性調節機構として、前述の5配位NO-ヘム形成の他に、*S*-ニトロシル化による活性化の可能性を検討する。
- (3)HRIの活性化の初期段階で生じる自己リン酸化反応による活性化について、リン酸化されるSer、Thr、及びTyrなどのアミノ酸残基を同定する。
- (4)HRIを結晶化し、X線結晶構造解析によってHRIの立体構造を明らかにする。

3. 研究の方法

大腸菌内で大量発現したHRIを、Niアフィニティ、陰イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。図1は以前の研究によるHRIの活性化モデルを示している。

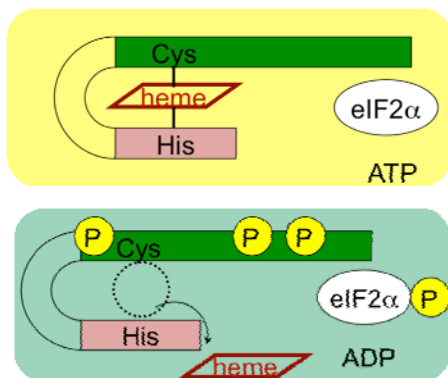


図1:HRIのドメイン構造と活性化モデル
ヘムが結合した不活性型(上)、ヘムが解離し自己リン酸化によって活性化したHRI(下)
赤、緑がそれぞれN末端、キナーゼドメイン

(1)HRIのヘム結合に関与すると考えられるCys及びHis残基は、それぞれキナーゼドメイン、N末端ドメインに存在する。全長型HRIには9つのCys、20つのHisがあるが、そのうち6つのCysがキナーゼドメインに、7つのHisがN末端ドメインに位置する。CysをSer、HisをAlaもしくはLeuへと置換した13種類の変異体を作製し、そのヘム結合性を吸収スペクトル及び円二色性スペクトルを測定した。

(2)ヘムが結合したHRIとヘムが結合していないHRIの両方に対して、NO供与体として、NOC9及び*S*-ニトロソグルタチオン(GSNO)を用いて、活性測定を行った。また、HRIのCysが*S*-ニトロシル化されるかどうかをSaville法で検出を行った。HRIに結合したNOは水銀との反応によってHNO₂へと変換され、以下の反応によって、540 nmに吸収を持つアゾ化合物へと変換し定量を行った(図2)。

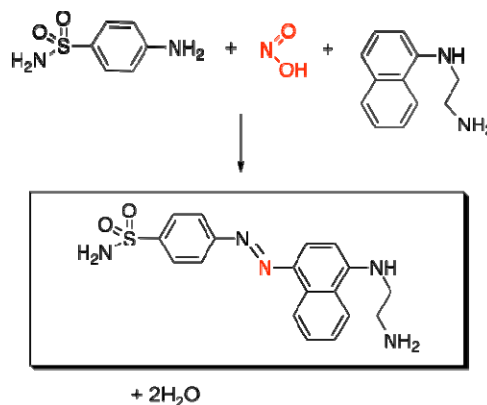


図2:Saville法によるSNOの同定

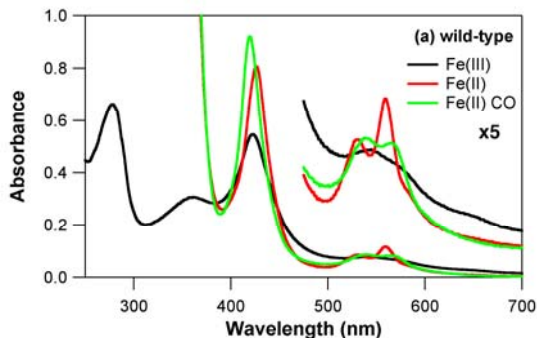
(3)HRIの自己リン酸化部位の同定は、HRIをトリプシンで消化し、リン酸化ペプチドをGa-IMACカラムを用いて濃縮し、LC-MS/MS解析を行った。

(4)ヘムの結合に伴う構造変化を明らかにするために、ヘムが結合したHRIとヘムが結合していないHRIの両方に対して、市販のスクリーニングキットを用いて結晶化条件を約700種類検討した。また、HRIのN末端ドメインとキナーゼドメインとの間の相互作用について、Hisタグの結合したN末端ドメインとキナーゼドメインを調整し、Niアフィニティカラムを用いたpull-downアッセイを行った。

4. 研究成果

大腸菌で発現、精製を行ったHRIは、培地11当たり約1 mgの収量で得られた。また、精製HRIは既に自己リン酸化した、活性型であった。

(1)Cys208, 385, 409, 464, 491, 550の変異体の内、Cys409Ser変異体のみが、ヘムとの結合能を失った。Cys409はヘム制御モチーフもしくはCPモチーフと呼ばれるヘム結合配列に位置しており、Pro410をAlaへ変異した場合も同様に、ヘムの結合能が無くなった(図3)。また、ヘム制御モチーフによるヘムの結合を直接観測できたことは極めて重要である。一方、His75, 78, 80, 86,119,120,126をAlaへと置換した変異体では、ヘム結合に顕著な違いは見出されなかった。しかし、His119及びHis120の両方をAlaへと置換した場合、ヘム結合能は大きく減少した。この結果より、His119またはHis120がヘムの軸配位子である可能性が示唆された。



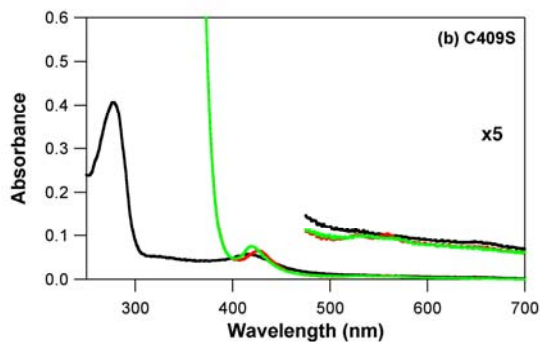


図 3:ヘム結合型 HRI の吸収スペクトル
(a) 野生型、(b) Cys409Ser 変異体

円二色性スペクトルより、His119Ala 変異体と His120Ala 変異体を比較したところ、His119 変異体が野生型、His120 変異体とやや異なるスペクトルを与えた。

(2) ヘム結合型 HRI に対して、NO 供与体として NOC9 を添加するとキナーゼ活性が 3 倍上昇し、可溶性グアニル酸シクラーゼと同様に 5 配位 NO-ヘム構造を取ることがわかっている。今回、NO による活性調節機構の 1 つとして、S-ニトロソチオール(SNO)修飾が起こるのかを GSNO を用いて検討した。HRI を 10 等量の GSNO と反応させ、Saville 法によって SNO 化部位を定量したところ、ヘム結合型では 3 等量、ヘム非結合型では 5 等量の SNO 修飾が確認された。さらに、SNO 化部位を特定するために、Cys 変異体の解析を行っている。

(3) LC-MS/MS 解析の結果、24 カ所のリン酸化部位を同定した。大部分のリン酸化部位はキナーゼインサートと呼ばれる部分に集中していた。また、これらのリン酸化部位の役割について、個々の Ser, Thr, Tyr を置換した変異体を作製し、活性測定を行ったところ、活性化ループ内の Thr490 のリン酸化が HRI の活性に必須であることがわかった。

(4) 全長型 HRI の結晶化条件について 700 種類のスクリーニングを行ったが、未だに結晶化には成功していない。N 末端ドメインを取り除いた、キナーゼドメインのみの結晶化も試みている。

また、ヘム結合による構造変化を His タグ pull-down アッセイを用いて解析したところ、N 末端ドメインとキナーゼドメインの間には、ヘム存在下でのみ相互作用が発生し、ヘム非存在下では、この相互作用が消失することが明らかになった(図 4)。

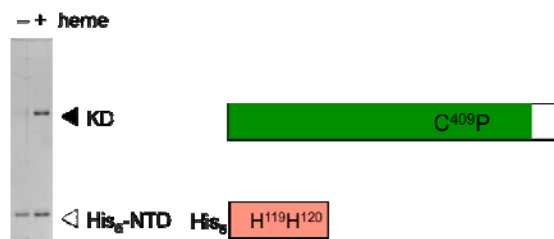


図 4:His タグ pull-down アッセイ

最後に、本研究成果をまとめた図 5 を示す。

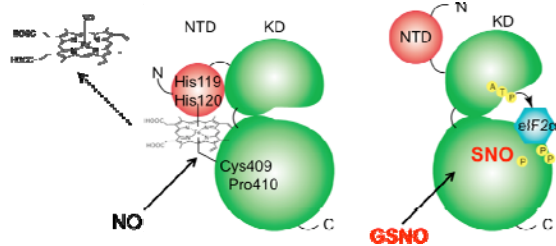


図 5:HRI の活性化機構

(左)ヘムを結合した不活性型 HRI は Cys409 と His119 もしくは His120 によってヘムと結合し、N 末端ドメイン(NTD)とキナーゼドメイン(KD)間に相互作用が生じる。

(右)1)NO とヘムが 5 配位 NO-ヘムを形成して、タンパク質から解離する。2)GSNO によって S-ニトロシル化する。などによってヘムが結合していない活性型 HRI となる。この際、自己リン酸化が引き起こされ、NTD と KD との相互作用は消失する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

- ① Igarashi, J., Murase, M., Iizuka, A., Pichierri, F., Martinkova, M. and Shimizu, T. “Elucidation of the heme-binding site of heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins” *J. Biol. Chem.* 283, 18782-18791 (2008) 査読:有
- ② Ishitsuka, Y., Araki, Y., Tanaka, A., Igarashi, J., Ito, O. and Shimizu, T. “Arg97 at the heme-distal side of the isolated heme-bound PAS domain of a heme-based oxygen sensor from *Escherichia coli* (*EcDOS*) plays critical roles in autoxidation and binding to gases, particularly O $_2$ ” *Biochemistry* 47, 8874-8884 (2008) 査読:有
- ③ Kitanishi, K., Igarashi, J., Hayasaka, K., Hikage, N., Saiful, I., Yamauchi, S., Uchida, T., Ishimori, K. and Shimizu, T. “Heme-binding characteristics of the isolated PAS-A domain of mouse Per2, a transcriptional regulatory factor associated with circadian rhythms” *Biochemistry* 47, 6157-6168 (2008) 査読:有
- ④ 五十嵐城太郎、清水透 “ヘムが移動して

機能する生体反応—ヘムの移動により機能する蛋白質・酵素の機能” *化学*, 63, 66-67 (2008) 査読:無

- ⑤ Igarashi, J., Kitanishi, K., Martinkova, M., Murase, M., Iizuka, A. and Shimizu, T. “The roles of thiolate-heme proteins, other than the P450 cytochromes, in the regulation of heme-sensor proteins” *Acta Chim. Slov.* 55, 67-74 (2008) 査読:有
- ⑥ Martinkova, M., Igarashi, J. and Shimizu, T. “Eukaryotic initiation factor 2 α kinase is a nitric oxide-responsive mercury sensor enzyme: potent inhibition of catalysis by the mercury cation and reversal by nitric oxide” *FEBS Lett.* 581, 4109-4114 (2007) 査読:有
- ⑦ Hirai, K., Martinkova, M., Igarashi, J., Saiful, I., Yamauchi, S., El-Mashtoly, S. F., Kitagawa, T. and Shimizu, T. “Identification of Cys385 in the isolated kinase insertion domain of heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) as the heme axial ligand by site-directed mutagenesis and spectral characterization” *J. Inorg. Biochem.* 101, 1172-1179 (2007) 査読:有
- ⑧ 五十嵐城太郎、田中敦成、清水透 “ドメイン間相互作用による酵素活性の制御” *生体の科学* 58, 354-356 (2007) 査読:無

[学会発表] (計 5 件)

- ① Jotaro Igarashi, Motohiko Murase, Toru Shimizu “Identification of the heme axial ligand of HRI: Role of heme regulator motifs” 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 BMB2008、神戸(2008年12月10日)
- ② Jotaro Igarashi, Motohiko Murase, Aya Iizuka, Fabio Pichierri, Marketa Martinkova, Toru Shimizu “Elucidation of the heme-binding site of heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins” *Gordon Research Conference on the Chemistry and Biology of Tetrapyrroles*, Newport, RI, U. S. A. (2008年7月21-24日)
- ③ Jotaro Igarashi, Arika Matsuoka, Toru Shimizu “Oxygen stability and crystal

structure of *Tetrahymena* truncated hemoglobin” 日本生物物理学会第45回年会、横浜(2007年12月23日)

- ④ Jotaro Igarashi, Motohiko Murase, Aya Iizuka, Marketa Miksanova, Toru Shimizu “Identification of the heme axial ligand, Cys, of HRI: Role of heme regulatory motifs” 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 BMB2007、横浜(2007年12月11日)
- ⑤ Jotaro Igarashi, Aya Iizuka, Motohiko Murase, Marketa Martinkova, Toru Shimizu “Identification of a heme axial ligand of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase (HRI): Role of the Cys-Pro motif in heme regulation” *13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry*, Vienna, Austria (2007年7月17日)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/shimizu/>

http://db.tohoku.ac.jp/whois/Tunv_Title_All.php?&user_num=z8/Pz8/Pz8/Mz8zH&sel1=1&sel2=1&sel3=1&sel4=0&page=1&lang=J

6. 研究組織

(1)研究代表者

五十嵐 城太郎 (IGARASHI JOTARO)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号:80375162